动 物 学 研 究 1999, Jun. 20 (3): 235～238
Zoological Research

CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853

# 人胚肺二倍体细胞株 KMB17 凋亡模型的建立

# APOPTOTIC MODEL OF HUMAN EMBRYONIC DIPLOID LUNG FIBROBLAST INDUCED BY SERUM DEPRIVATION

胡云章 邵聪文

关键词 人二倍体细胞，细胞凋亡，无血清培养
Key words Human embryonic lung diploid fibroblast, Apoptosis, Serum-free cell culture
中图分类号 R392.12 R329.28

细胞凋亡作为生命的基本现象之一受到科学界的广泛重视（Linda 等, 1998), 对其机理和应用的研究已渗透到生命科学的各个领域，成为当今生命科学领域的研究热点。特别是以动物细胞为培养基质的医药生物技术领域尤显重要。因为动物细胞培养技术是现代生物技术研究和开发的关键技术之一。大规模动物细胞培养为疫苗、干扰素、激素、生长因子、酶和单克隆抗体等制品的生产提供了有效的技术手段，利用动物细胞技术生产的生物制品已占世界生物高技术产品市场份额的 50%（Cooney, 1995)。动物细胞培养过程中的细胞凋亡是影响生物技术产品产量和质量的重要因素。一方面细胞凋亡使产品的产量下降；另一方面凋亡细胞释放的蛋白酶可降解细胞的目的产物；再一方面凋亡过程中产生的自由基修饰目的蛋白因子，使之失去正确的空间构象，严重影响产品的质量（Alan, 1998; Timan 等, 1997)。因此，通过抑制细胞凋亡优化细胞培养工艺，特别是发酵罐培养工艺，已成为提高生物技术产品产量和质量的重要技术手段（Mastrangelo, 1998)。人胚肺二倍体细胞株 KMB17 是我国自己建立、并经卫生部批准正式用于生物制品生产的两株人二倍体细胞之一（Guo, 1981)。自 1992 年以来，已成功地实现使用该细胞株大规模产业化生产我国自行研制的甲型肝炎减毒活疫苗（H2 株)。并建立了产业化的细胞培养工艺（Mao 等, 1997), 取得了显著的经济效益和社会效益。目前正将该细胞株推广应用于脊髓灰质炎减毒活疫苗产业化生产。近年来发现，在大规模的细胞培养过程中存在细胞易发芽、圆缩、脱落等形态异常的细胞凋亡问题，影响了疫苗的产量和质量。目前，国内外尚未见有关细胞凋亡与病毒疫苗产量关系的报道，特别是人二倍体细胞（KMB17）凋亡与病毒繁殖关系的报道。本文通过无血清培养方法建立人胚肺二倍体细胞株 KMB17 的凋亡模型。拟为进一步研究通过抑制细胞凋亡提高疫苗的产量，降低成本，为生物制品产业化奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 人胚肺二倍体细胞株 KMB17** 由医学生物学研究所提供。

**1.2 甲型肝炎病毒减毒株（H2）** 由医学生物学研究所提供。

**1.3 无血清诱导细胞凋亡** 将代次为 20～30 代、正常生长的人二倍体细胞(KMB17)用胰蛋白酶消化后分种于塑料培养瓶中(T25 Corning),细胞生长营养液为:新生牛血清 10%、MEM 水解乳蛋白混合液 85%、谷氨酰胺 2%、卡拉霉素。37℃ 培养 3 d, 细胞长成汇流状单层后，倾弃生长营养液，加入不含血清的生长营养液后，置 37℃ 培养，同时每隔 30 min 显微镜下观察，出现细胞圆缩时，将正常梭形形态细胞及变成圆形的细胞用胰蛋白酶消化后加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS),离心弃上清、加入 70%的冷乙醇固定细胞，保存于－20℃备用(周剑峰等,1997)。

**1.4 流式细胞仪检测凋亡细胞** 将乙醇固定的细胞离心后加入磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗 2 次。用含 Propidium iodide (PI)荧光染料(50 μg/mL) 及 0.1% Triton X－100 的 1 mL 柠檬酸盐缓冲液悬浮沉淀细胞，置 4℃ 保存过夜。将 PI 染色的细胞置激发光为 480 nm 波长的 EPICS XL 流式细胞仪(Coulter, Hialeah, Fla. USA)检测。每个样品检测 $10^4$ 细胞，重复 3 次。用 Lysis Ⅱ 软件分析结果。同时以含血清培养的细胞为对照(Emmanuel 等,1997)。

**1.5 DNA 断裂的凝胶电泳分析** 将收集的细胞加入 1 mL 裂解液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 25 mmol/L ETDA, 0.5% SDS, 0.2 mg/mL proteinase K), 56℃ 裂解 4 h 后，用等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次，再用氯仿异戊醇(24:1)抽提。抽提上清加入冷无水乙醇沉淀 DNA, 4℃、14 000 g 离心 30 min, 冷无水乙醇洗 2 次、室温下干燥后加入 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/

本文 1999－01－12 收到，1999－03－11 修回




图1 人胚肺二倍体细胞KMB17无血清诱导凋亡后细胞学观察

Fig.1 Apoptotic morphological alteration of human diploid fibroblast KMB17

A. 正常KMB17细胞普通镜检(the normal KMB17 cells under light microscope)×200
B. KMB17凋亡细胞的普通镜检(the apoptotic KMB17 cells under light microscope)×200
C. 正常KMB17细胞的PI染色(PI staining for control KMB17 cells)×400
D. KMB17凋亡细胞PI染色(PI staining for apoptotic KMB7 cells)×400
E. 正常细胞电镜观察(the nuclear structure of control KMB17 cells under transmission electronic scopy)×20 000
F. KMB17凋亡细胞电镜观察:示染色质凝聚成块分布于核膜边缘呈新月状(apoptotic KMB17 cells: chromatin condensation into crescent lump near nuclear membrane)×20 000

L EDTA,0.5 mg/mL RNAase,37℃消化2 h。用1%琼脂、40 V电压电泳,Ethidium bromide染色后观察(Fumio等,1998)。

**1.6 光学显微镜观察** 在不同的培养时间,将经过无血清培养诱导的细胞及正常生长的细胞置于Olympus相差显微镜下观察。正常的KMB17细胞呈细梭形,凋亡细胞由梭形圆缩,随后从培养瓶壁上脱落。

**1.7 荧光显微镜观察** 将离心收集细胞与丫啶橙(AO)混合后涂于载玻片上,置于Zeiss axioplan荧光显微镜下观察(熊琛等,1998)。使用成像处理系统(Astromed/Visilog.PC 486DX2,66 MHz VL),水银灯作为激发光源、470～490 nm滤光片及500 nm双色光栅。荧光显色通过520～550滤光

片成像。

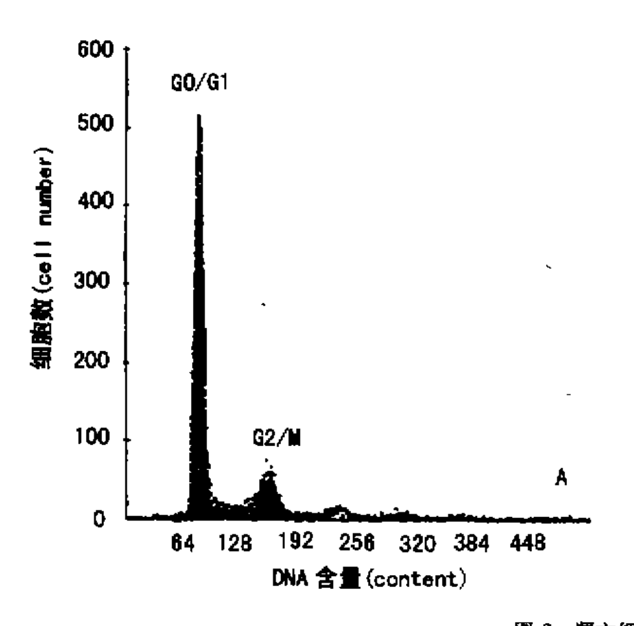
**1.8 电镜观察** 离心收集的细胞用 2.5%戊二醛与 $OsO_4$ 双固定后，经梯度丙酮脱水，Epon812 包埋，醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色后，于 JEM－100CX 电镜下观察。

## 2 结 果

**2.1 人二倍体细胞 KMB17 凋亡的形态特征** 人二倍体细胞长成汇流状单层后，换成无血清培养液 2 h，光学显微镜下可见正常梭形的细胞体积缩小，细胞由长梭形逐渐缩小为圆形，细胞质膜表面出芽、细胞间出现空隙，部分细胞脱落至溶液中（图 1：A 、B）。细胞经丫啶橙染色，在荧光显微镜下可见正常细胞核呈圆形、染色质均匀（图 1C)，而无血清诱导的细胞胞核出现凝缩、染色质集中于核膜周边（图 1D)。电镜结果进一步证明凋亡时核染色质凝缩后分步于核膜边缘呈新月状以及随后形成的凋亡小体（图 1：D、F)。




图 3 KMB17 细胞 DNA 凝胶电泳
Fig. 3 DNA Electrophoresis of KMB17 cells
Lane 1．无血清诱导后 KMB17 凋亡细胞（the apoptotic cells after serum-free culture)；Lane 2、正常 KMB17 细胞（the control KMB17 cells)；Lane M.DNA 标准分子量（DNA marker)。



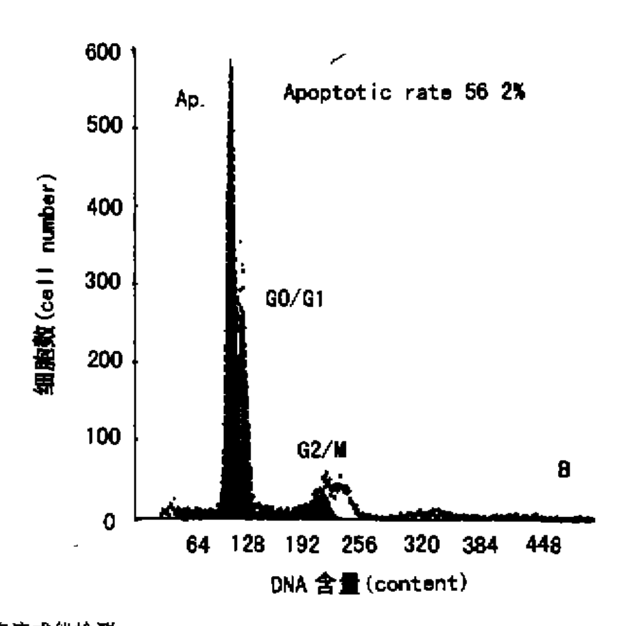




图 2 凋亡细胞流式仪检测
Fig. 2 Apoptotic detection by flow cytometer
A. 正常 KMB17 细胞（control KMB17 cells)；B.KMB17 凋亡细胞在 G0/G1 峰前出现凋亡峰（apoptotic peak of apoptotic KMB17 cells)。

**2.2 流式细胞仪检测的凋亡特征** 流式细胞仪被认为是当今检测细胞凋亡最敏感、最可靠的检测方法。汇流状细胞经无血清诱导 8 h 出现圆缩时，用流式细胞仪检测，在正常的 G0/G1 峰前出现一个明显、典型的凋亡峰，凋亡比率达 56.2%，而未经诱导的细胞在 G0/G1 峰前则无凋亡峰出现（图 2)。

**2.3 生化特征** DNA 电泳显示汇流状细胞经无血清诱导后出现断裂，但不是典型的梯形电泳。而正常对照则未出现 DNA 断裂（图 3)。

## 3 讨 论

细胞凋亡是一种不同于细胞坏死的细胞死亡方式。二者在形态、生理特征及生化性质上有明显差异。在凋亡过程中呈现细胞间联系中断，细胞质密度增大，体积缩小，染色质固缩分离并趋向于核膜形成新月状进而出现有膜包被的凋亡小体。其生化特征是 DNA 断裂形成寡核小体大小的片段，在 DNA 电泳上出现梯形（Steller，1995)。目前，细胞凋亡通常以 5 个指标确定，即光镜下细胞圆缩、荧光镜下细胞核凝缩甚至裂解成凋亡小体、DNA 电泳呈梯形、电镜下核异染色质凝缩于核膜边缘呈新月状、流式细胞仪检测在正常的 G0/G1 峰前出现特异性的凋亡峰。我们用无血清方法培养人二倍体细胞 KMB17 结果出现典型的凋亡特征：细胞由正常梭形圆缩、从培养瓶脱落、细胞核出现

染色质凝缩、呈新月状分布于核膜周围、出现凋亡小体；流式细胞仪检测有明显凋亡峰出现，凋亡率达56.2%；但DNA电泳未呈现典型的梯形。这一结果与最新研究发现凋亡时有的成纤维细胞不出现典型的梯形电泳、而呈现随机断裂的特征一致（胡庆柳等，1998），说明DNA梯形电泳与细胞本身的遗传特性有关。我们的研究表明确定成纤维细胞凋亡的指标可以是光镜下细胞圆缩、表面出芽；荧光镜下核凝缩、凋亡小体形成；电镜下核异染色质凝缩于核膜边缘呈新月状；特异性的凋亡峰；DNA断裂等7个指标。但DNA断裂不一定是典型的梯形。研究证实：选用无血清培养法诱导细胞凋亡是研究细胞凋亡的常规方法，具有简便、快速的特点（Andreas，1997）；流式细胞仪检测最敏感、最可靠。因此，我们用无血清方法确立了人胚肺二倍体细胞株KMB17的凋亡模型。此外，在用该细胞株生产甲肝减毒活疫苗的细胞培养过程中发现，由于培养周期长达28 d，培养后期在某些因素影响下如血清缺乏时细胞会出现圆缩和DNA断裂的凋亡现象，提示可以通过抑制凋亡优化培养条件，使细胞维持在正常的生理状态。这一模型的建立将为进一步研究细胞凋亡与病毒繁殖、提高疫苗产量质量的关系奠定基础。

## 参 考 文 献


周剑峰，陈 燕，李崇渔等，1997 一种可检测细胞凋亡多项指标的样品处理．癌症，16(4)：248－253．[ZOU Jian-feng，CHEN Yan，LI Chong-yu *et al*，1997．A method for handling samples applicable for multiple parameters analysis of apoptosis．*Cancer*，16(4)：248－253．]

胡庆柳，丁振华，谭小华，1998 凋亡而不出现DNA梯形带一例 细胞生物学杂志，20(2)：76－78．[HU Qing-liu，DING Zhen-hua，TAN Xiao-hua，1998．An example of apoptosis without DNA ladders．*J．Cell Biol*．，20(2)：76－78．]

熊 琛，郭怀兰，陈诸云等，1998．光学及荧光显微镜在细胞凋亡检测中的应用．同济医科大学学报，27(3)：184－186．[XIONG Chen，GUO Huai-lan，CHENG Zhu-yun *et al*，1998．Application of light microscope and fluoroscope in detection of apoptosis *Acta Univ．Med Tongji*．，27(3)：184－186．]

Andreas S，Gerald B，Hermann F *et al*，1997．Cell death of AKR－2B fibroblasts after serum removal：a process between apoptosis and necrosis J *Cell Sci*．，110(3)：819－828．

Alan J D，1998．Apoptosis regulation and its application to biotechnology．*Trends in Biotechnology*，16(8)：339－342．

Cooney C L，1995．Are we prepared for the animal cell technology in the 21st century？*Cytotechnology*，18(1)：3－8．

Emmanuel H，Stephen H，Franck D *et al*，1997 Bovine herpesvirus 1－induced apoptosis occurs at G0/G1 phase of the cycle *Virology*，232(1)：351－358．

Fumio F，Mutsuo M，Kstsduhiko A *et al*，1998 Modulation of apooptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide．*Experimental Cell Res*．，242(1)：92－99

Guo R，Cao Y Y，Dai Z Z *et al*，1981．Characteristics of a human diploid cell line（KMB17）*Proc．Chinese Acad．Med．Sci*，3(1)：226－230．

Linda J M，Jean M，1998．Apoptosis．*Science*，281(8)：1301－1302．

Mao J S，Chai S A，Xie R Y *et al*，1997．Further evaluation of safety and protective efficacy of live attenuated hepatitis a vaccine（H2－strain）in humans．*Vaccine*，15(9)：944－947．

Mastrangelo A J，1998．Overcome apoptosis．*Trends in Biotechnology*，16(2)：88－95．

Steller H．1995．Mechanisms and genes of cellular suide *Science*，267(18)：1445－1449．

Titman G，Thomas R，Kelvin J A，1997．Degradation of oxidized proteins in mammalian cells．*FASEB J*．，11(6)：526－534．



胡云章 邵聪文 胡凝珠 李艳平
HU Yun-zhang SHAO Cong-wen HU Ning-zhu LI Yan-ping
钱亚屏 何继宏 瞿 素 梁 燕
QIAN Ya-ping HE Ji-hong QU Su LIANG Yang
（中国医学科学院 / 中国协和医科大学 医学生物学研究所 昆明 650107）
（*Institute of Medical Biology*，*Kunming* 650107）